

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-65895

(43) 公開日 平成9年(1997)3月11日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/37		7823-4B	C 1 2 Q 1/37	
G 0 1 N 33/50			G 0 1 N 33/50	Z
// C 1 2 Q 1/56		7823-4B	C 1 2 Q 1/56	

審査請求 未請求 請求項の数11 F D (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願平7-247045	(71) 出願人	000003975 日東紡績株式会社 福島県福島市郷野目字東1番地
(22) 出願日	平成7年(1995)9月1日	(72) 発明者	片山 勝博 郡山市富田町字大十内80-21
		(72) 発明者	松浦 斎 郡山市緑ヶ丘東1丁目12-15

(54) 【発明の名称】  $\alpha_2$  - プラスミンインヒビターの測定方法及び測定試

薬

(57) 【要約】

【目的】 再溶解したり、希釈したりせず、すなわち、試薬調製に時間と手間のかからない、かつ、長時間、測定試薬を保存しておいても、正確に  $\alpha_2$  - P I を測定できる方法を提供する。

【構成】  $\alpha_2$  - プラスミンインヒビターを含む血漿に、スクロースを含むプラスミン試薬を添加し、次ぎに、得られる混合液の残存プラスミンとプラスミン合成基質試薬を反応させることにより、その  $\alpha_2$  - プラスミンインヒビターを測定する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】  $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターを含む試料と、過剰量のプラスミン試薬とを混合することにより、プラスミンとその $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターとを反応させ、次に、残存プラスミン活性を測定することにより、その試料中の $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターを測定する方法において、そのプラスミン試薬が、炭素数4～24の非還元性糖を含むプラスミン試薬であることを特徴とする試料中の $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターを測定する方法。

【請求項2】 試料中の $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターを測定するキットであって、炭素数4～24の非還元性糖を含むプラスミン試薬ユニット、及びプラスミン用合成基質を含む試薬ユニットを、必須ユニットとして含む $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター測定試薬。

【請求項3】 炭素数1～21の非還元性糖を含むプラスミン試薬が、濃度1～60%の炭素数4～24の非還元性糖を含む、プラスミン試薬である請求項2記載の $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター測定試薬。

【請求項4】 炭素数1～21の非還元性糖が、炭素数6～18の非還元性糖である請求項2又は3記載の $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター測定試薬。

【請求項5】 炭素数1～21の非還元性糖がソルビトール、トレハロース、スクロースから選ばれる請求項2又は3記載の $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター測定試薬。

【請求項6】 プラスミン試薬が液状である請求項2、3、4、5から選ばれる $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター測定試薬。

【請求項7】 炭素数4～24の非還元性糖を含むプラスミン試薬。

【請求項8】 濃度0.001～100単位/mlのプラスミン、濃度1～60%の炭素数4～24の非還元性糖、及び濃度0.005～3.0Mの塩を含む、pH6～10の液状プラスミン試薬。

【請求項9】 濃度0.001～100単位/mlのプラスミン、濃度1～60%の炭素数4～24の非還元性糖、及び濃度0.005～3.0Mの塩を含む、pH6～10のプラスミン溶液で該溶液中のプラスミンを保存する方法。

【請求項10】 炭素数4～24の非還元性糖がソルビトール、トレハロース、スクロースから選ばれる請求項9記載のプラスミンを保存する方法。

【請求項11】 プロテアーゼに炭素数4～24の非還元性糖を存在させることにより該プロテアーゼを保存する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、臨床検査に用いられる $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターを測定する方法及び $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター測定試薬、プラスミンを

保存する方法、並びにプロテアーゼを保存する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター（以下、 $\alpha_2$ -PIと記載することもある）はプラスミンと即時に反応し、 $\alpha_2$ -PI・プラスミン錯体を形成することによりプラスミン酵素活性を阻害する。また、 $\alpha_2$ -PIは、フィブリノーゲンによるプラスミンへの結合を阻害する性質を有する線溶阻害因子として知られており、血液中のその濃度低下が問題とされる。 $\alpha_2$ -PIの濃度が低下する疾患としては、 $\alpha_2$ -PI先天性欠損症、 $\alpha_2$ -PI異常症、肝疾患、DIC（広汎性凝固症候群）等が知られている。従って、 $\alpha_2$ -PIは、これらの病気の診断のための、重要な指標となっている。

【0003】 $\alpha_2$ -PIを測定する方法としては免疫学的測定法と活性測定法に大別される。免疫学的測定法は、 $\alpha_2$ -PIの構造部分を認識して $\alpha_2$ -PIを測定する方法であるため、不活性な $\alpha_2$ -PI・プラスミン錯体も、活性な $\alpha_2$ -PIと同様、測定する。そのため、この測定方法では、活性を有する $\alpha_2$ -PIを正確に反映するデータを得られないという欠点がある。その結果、 $\alpha_2$ -PIを測定する方法としては活性測定法が一般的である。

【0004】活性測定法の場合、通常、 $\alpha_2$ -PIを含む試料に、過剰量のプラスミン試薬を添加して、プラスミンとその $\alpha_2$ -PIとを反応させ、次いで、残存プラスミン活性を測定することにより、試料中の $\alpha_2$ -PIを測定する方法が主流となっている。特に、試料に一定過剰量のプラスミンを添加して、プラスミンとその $\alpha_2$ -PIとを反応させ、反応を行わせた後、残存プラスミンとプラスミン用合成基質とを反応させて残存プラスミン活性を測定し、用いた試薬のプラスミン活性とその残存プラスミン活性との比較から $\alpha_2$ -PI活性を算出する測定方法が用いられる。このような合成基質による $\alpha_2$ -PI測定方法としては、例えば、Petter Friberger, The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation, 42巻, 41-48頁（1982年）等に記載されている。

【0005】このような合成基質法による $\alpha_2$ -PI測定試薬は、過剰量のプラスミンを含むプラスミン試薬ユニットと、プラスミン用合成基質試薬ユニットとから、構成されている。しかし、これらの構成試薬中、特にプラスミン試薬は自己分解性のプロテアーゼであるプラスミンが主成分であるため非常に不安定である。その結果、これらの試薬を液状で保存しておく、試料中のプラスミン活性が低下するため、試料中の $\alpha_2$ -PIを正確に測定できないという問題があった。

【0006】一方、プラスミン試薬を安定に保存する方法がいくつか開発されてきている。その方法としては、

凍結乾燥品とする方法、又は液状で保存する方法が知られている。

【0007】凍結乾燥品を用いる方法では、あらかじめ、プラスミンを溶解して、液状のプラスミン試薬を調製し、その試薬を凍結乾燥して凍結乾燥品として冷蔵保存し、さらに、測定の際、その凍結乾燥品を再溶解して、試料中の $\alpha_2$ -PIを測定しなければならない。そのため、 $\alpha_2$ -PIを測定する使用者側にとっては試薬を溶解して調製しなければならないという不便性、溶解時の調製ミスの可能性、また、専用の溶解液の添付のため試薬数が多いことによる保管場所の問題がある。また、製造者側にとっては凍結乾燥という製造工程が必要であり、その結果、試薬の調製に長時間かかるという問題点がある。

【0008】液状でプラスミンを保存して使用する方法としては、3.2Mの硫酸アンモニウムに懸濁し冷蔵保存する方法、25%グリセロールを含む0.05Mトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン-0.02Mリジン-0.1M塩化ナトリウム-0.001Mエチレンジアミン4酢酸(2ナトリウム塩)、pH9.0緩衝液中濃厚液として-20℃から-30℃で冷蔵する方法[Methods in ENZYMOLOGY, 19巻, 184~199頁]等が知られている。しかし、これらの方法では、いずれのプラスミン試薬も、 $\alpha_2$ -PIを測定する際、そのまま、使用することはできず、再溶解したり、希釈したり、なんらかの前処理をしたうえで、 $\alpha_2$ -PIを測定することが必要であった。また、グリセロールを使用する場合は、プラスミン試薬が粘稠になりやすく、そのため、測定値に誤差を与えやすくなるという問題があった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】上記の $\alpha_2$ -PI測定試薬の問題を解決し、再溶解したり、希釈したりせず、すなわち、試薬調製に時間と手間のかからない、かつ、長時間、測定試薬を保存しておいても、正確に $\alpha_2$ -PIを測定できる方法及びそのための試薬を提供するというのが本発明の課題である。また、液状で長期間保存しても、プラスミン活性が低下しないプラスミン試薬、及びプラスミンを保存する方法を提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】このような課題に鑑み、本発明者らが鋭意研究を重ねた結果、驚くべきことに、その不安定性のために試薬の液状化を妨げていたプラスミンが、試薬組成中にある種の非還元性糖類を存在させることにより長期にわたり活性が保持され、その結果、それを用いて、 $\alpha_2$ -PIを正確に測定でき得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】請求項1に係る発明は、 $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターを含む試料と、過剰量のプラスミン試薬とを混合することにより、プラスミンとその $\alpha_2$ -プラス

ミンインヒビターとを反応させ、次に、残存プラスミン活性を測定することにより、その試料中の $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターを測定する方法において、そのプラスミン試薬が、炭素数4~24の非還元性糖を含むプラスミン試薬であることを特徴とする試料中の $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターを測定する方法である。

【0012】請求項1に係る発明は、

i) プラスミン試薬が、液状で適当な温度で保存しておいても安定であり、しかも、粘稠でないで、 $\alpha_2$ -PIを正確に測定でき；ii) 試薬を調製して、液状で保存しておいても、再溶解、希釈、その他の前処理が必要がなく、そのまま、測定できるという効果を有する。なお、適当な温度とは、通常、1~30℃である。

【0013】 $\alpha_2$ -PIを含む試料は、種々のものを使用でき、 $\alpha_2$ -PIを測定したいものなら特に制限はない。例えば、血漿、血清等の体液やそれらの希釈液及び処理液が挙げられる。

【0014】請求項1に係る発明においては、プラスミン試薬が過剰量であり、かつ、炭素数4~24の非還元性糖を含む。プラスミンが過剰量必要なのは、試料中の $\alpha_2$ -PIをプラスミンにより $\alpha_2$ -PI・プラスミン錯体に変換させ、さらに、第1段階終了後の液に、測定でき得る残存プラスミンを存在させるための十分な量のプラスミンを確保するためである。

【0015】過剰量のプラスミン試薬とは、試料中の $\alpha_2$ -PIのプラスミン阻害活性を消失させることができ、その消失の後、測定できうる残存プラスミンを存在させ得る量のプラスミンを含む試薬である。

【0016】プラスミン試薬中のプラスミン濃度は、試料の $\alpha_2$ -PI濃度により異なるが、通常、0.001から100単位/ml、好ましくは0.01から10単位/mlである。なお、本明細書において、プラスミン1単位は基質NS-2200を1分間に1 $\mu$ mole水解する酵素量をいうものとする。

【0017】請求項1に係る発明においては、プラスミン試薬が炭素数4~24の非還元性糖を含むプラスミン試薬であることを特徴とする。このため、本発明のプラスミン試薬は、液状で適当な条件で保存しておけば、プラスミン活性が減少しづらいので、試薬を調製した後、長期間経過しても、試料中の $\alpha_2$ -PIを正確に測定できるという好ましい効果を有する。本明細書において、非還元性糖とは、遊離の還元基を持たない糖類を表わし、非還元性オリゴ糖、糖アルコール、配糖体、多糖類を含む。好ましくは非還元性オリゴ糖、糖アルコール、である。請求項1に係る発明において、炭素数4~24の非還元性糖としては、炭素数5~18の非還元性二糖又は糖アルコールが好ましい。炭素数5~18の非還元性二糖としては、トレハロース、スクロース等を例示することができる。炭素数5~18の糖アルコールとしては、ソルビトール、イノシトール等を例示することがで

きる。

【0018】本発明において、プラスミン試薬に含まれる、炭素数4〜24の非還元性糖の濃度は、好ましくは1〜60%、さらに好ましくは5〜45%、特に好ましくは10〜30%である。その濃度が薄すぎると、プラスミンの安定性が悪くなる結果、プラスミン試薬を長く放置すると、請求項1に係る測定方法で、試料中の $\alpha_2$ -PIを正確に測定できにくい。また、その濃度が濃すぎると、試薬が粘稠となり、 $\alpha_2$ -PIを正確に測定できにくい。

【0019】プラスミン試薬のpHは、プラスミンと $\alpha_2$ -PIとの反応の至適の点から、好ましくはpH6.0〜10.0、より好ましくはpH7.0〜9.0である。プラスミン試薬は、pH調整等のため、緩衝剤を含むことができる。プラスミン試薬の緩衝剤濃度は、好ましくは0.005〜1.000M、より好ましくは0.02〜0.30Mである。

【0020】pH調整の緩衝剤としてはトリス、りん酸、バルビタール、イミダゾール、ペロナル、グリシルグリシン、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPPSO、EPPS、Tricine、Bicine、TAPS等を使用できる。請求項2記載のプラスミン用合成基質を含む試薬においても、これら、各種のpH調整の緩衝剤を適時添加することができる。

【0021】プラスミン試薬は、安定性のため、さらに、塩を含むことが好ましい。この場合、塩は水溶性の塩であり、好ましくは水溶性の有機塩、ハロゲン化無機塩である。水溶性の有機塩としては、酢酸ナトリウム、酢酸カリウムを例示できる。水溶性のハロゲン化無機塩としては、塩化ナトリウム、塩化カリウムを例示できる。塩濃度は通常0.005〜3.0M、好ましくは0.05〜1.0M、より好ましくは0.2〜0.8Mである。

【0022】請求項1に係る発明においては、プラスミン試薬は：

i) 過剰量であり、かつ、ii) 炭素数4〜24の非還元性糖を含む、という要件に加え；測定しようとする試料の $\alpha_2$ -PIの量により異なるが、通常、

iii) プラスミン濃度が0.001から100単位/mlであり、

iv) 該非還元性糖の濃度が1〜60%であり、

v) pHが6.0〜10.0であり、

vi) 濃度0.005〜1.000Mの緩衝剤を含み、かつ、

vii) 濃度0.005〜3.0Mの塩を含む、ことが好ましい。

【0023】このようなプラスミン試薬に、試薬の性能等の面からEDTA、EGTA等のキレート剤、ポリブレン、プロタミン等のヘパリン阻害物質、Triton

X-100、Tween-20等の界面活性剤、糖類、アミノ酸類、アルブミン等の蛋白質、モノエチルアミン等のアミン化合物、ポリエチレングリコール、グリセロール等、各種の物質を適宜添加することができる。なお、請求項2に係る発明のプラスミン用合成基質を含む試薬にも、これらの添加物を、適宜、添加することもできる。

【0024】請求項1に係る発明の第1段階では、 $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターを含む試料と、過剰量のプラスミン試薬とを混合することにより、プラスミンとその $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターとを反応させる。これにより、試料中の $\alpha_2$ -PIのプラスミン阻害活性を失わせることができる。このとき、該プラスミン試薬に該試料を加えても良いし、該試料に該プラスミン試薬を加えても良い。

【0025】請求項1に係る発明の第2段階では、残存プラスミン活性を測定する。その方法としては、残存プラスミンとプラスミン用合成基質とを反応させ、残存プラスミンを測定する方法が好ましい。短時間で、簡単に、かつ、正確に残存プラスミンを測定できるからである。残存プラスミンとプラスミン用合成基質とを反応させると、その合成基質が開裂する。開裂して生成される物質を測定することにより残存プラスミンを測定することができる。

【0026】このような開裂して生成される物質は、色素、反応して色素を生成する物質等の色原体、蛍光物質、波長270〜340nmで吸光度を持つ物質等であることが測定しやすさの点から好ましい。そのうち、5AB、pNA等の色原体が好ましい。なお、5ABとは5-アミノ-2-ニトロ安息香酸残基を表わし、pNAとはp-ニトロアニリン残基を表わす。また、プラスミン用合成基質とは、プラスミンの酵素作用により選択的に開裂し、その開裂により生成する物質を測定できる合成基質をいう。

【0027】残存プラスミン活性を測定した後、あらかじめ作成した検量線から、試料中の $\alpha_2$ -PI活性を求めることができる。また、試料とプラスミン用合成基質を混合した後、該プラスミン試薬を加えて測定することもできる。

【0028】プラスミン用合成基質は溶液状態で安定なものが好ましい。そのような合成基質としては、NS-2200 (H-D-Gln (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>)-Phe-Lys-5AB)、S-2251 (H-D-Val-Leu-Lys-pNA)、Chromozyme (Tos-Gly-Pro-Lys-pNA)等の公知の基質がいずれも使用可能である。なお、本明細書において、C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>とは、シクロヘキシル基を表すものとする。

【0029】プラスミン用合成基質を含む試薬は、通常の $\alpha_2$ -PI測定の合成基質法の、プラスミン用合成基質を含む試薬を、そのまま、用いることができる。例え

ば、血漿中の $\alpha_2$ -PI測定する場合、該プラスミン用合成基質の濃度は、通常、0.01～50mMである。

【0030】請求項1に係る測定方法のうち、そのようなプラスミン用合成基質を用いる測定は、請求項2に係る発明の測定試薬を使用してできる。請求項2に係る発明は、試料中の $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターを測定するキットであって、炭素数4～24の非還元性糖を含むプラスミン試薬ユニット、及びプラスミン用合成基質を含む試薬ユニットを、必須ユニットとして含む $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター測定試薬である。請求項2に係る発明のプラスミン試薬、プラスミン用合成基質、プラスミン用合成基質を含む試薬、及び炭素数4～24の非還元性糖は、請求項1に係る発明のものをそのまま用いることができる。

【0031】請求項3に係る発明は、炭素数4～24の非還元性糖を含むプラスミン試薬が、1～60%の濃度の炭素数4～24の非還元性糖を含む、プラスミン試薬である請求項2記載の $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター測定試薬である。

【0032】請求項4に係る発明は、炭素数4～24の非還元性糖が、炭素数6～18の非還元性糖である請求項2又は3記載の $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター測定試薬である。

【0033】請求項5に係る発明は、炭素数4～24の非還元性糖がソルビトール、トレハロース、スクロースから選ばれる請求項2又は3記載の $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター測定試薬である。

【0034】請求項2～5に係る発明は、

i) 試薬を、溶解して液状にした後、適当な温度で保存しておけば、プラスミン試薬が安定であり、さらに、試薬が粘稠でないため、試料中の $\alpha_2$ -PIを正確に測定でき、

ii) 試薬を調製して保存しておいても、再溶解、希釈、その他の前処理が必要がない、という効果を有する簡便な $\alpha_2$ -PIの測定試薬である。

【0035】請求項6に係る発明は、プラスミン試薬が液状である請求項2、3、4、5から選ばれる $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター測定試薬である。請求項6に係る発明の $\alpha_2$ -プラスミンインヒビター測定試薬は、請求項2、3、4、5の発明の効果に加え、液状でもプラスミン試薬が安定なので、その試薬を溶解することなく、適当な温度で長時間、試薬を放置しても、 $\alpha_2$ -PIの測定に使用できる。

【0036】請求項7に係る発明は、炭素数4～24の非還元性糖を含むプラスミン試薬である。請求項7に係る発明は、

i) 溶解して液状にした後、適当な温度で保存しておいても安定なので、

ii) 一度調製すると、再溶解、希釈、その他の前処理が特に必要でないという効果を有する簡便なプラスミン試

薬である。このプラスミン試薬は、 $\alpha_2$ -PIの測定に使用できる。

【0037】請求項8に係る発明は、濃度0.001～100単位/mlのプラスミン、濃度1～60%の炭素数4～24の非還元性糖、及び濃度0.005～3.0Mの塩を含む、pH6～10の液状プラスミン試薬である。請求項8に係る発明は、請求項7に係る発明の効果に加え、通常では、液状ではプラスミン活性の保持が困難な、低濃度の0.001～100単位/mlのプラスミンを含む液状プラスミン試薬を、活性を十分保持しながら、保存できるという効果を有する液状プラスミン試薬である。

【0038】請求項9に係る発明は、濃度0.001～100単位/mlのプラスミン、濃度1～60%の炭素数4～24の非還元性糖、及び濃度0.005～3.0Mの塩を含む、pH6～10のプラスミン溶液で該溶液中のプラスミンを保存する方法である。請求項10に係る発明は、炭素数4～24の非還元性糖がソルビトール、トレハロース、スクロースから選ばれる請求項9記載のプラスミンを保存する方法である。請求項9又は10に係る発明は、通常では、プラスミン活性の保持が困難な、低濃度の0.001～100単位/mlのプラスミンを液状で保存できる効果を有する。請求項11に係る発明は、プロテアーゼに炭素数4～24の非還元性糖を存在させることにより該プロテアーゼを保存する方法である。請求項11に係る発明は、プラスミン等のプロテアーゼを安定に保存できる。

【0039】請求項1、2又は7に係る発明で、例えば、自動分析装置で血漿中の $\alpha_2$ -PIを測定するときには次のようにしてできる。

【0040】プラスミン試薬は、

i) 健常人血漿中の $\alpha_2$ -PIに対し、1.1～100当量のプラスミンを含み、

ii) 炭素数4～24の非還元性糖を含む、

iii) 該非還元性糖の濃度が1～60%であり、

iv) プラスミン濃度が0.001から100単位/mlであり、

v) pHが6.0～10.0であり、

vi) 濃度0.005～3.0Mの緩衝剤を含み、かつ、

vii) 濃度0.005～3.0Mの塩を含む、プラスミン試薬ユニットを使用する。

【0041】プラスミン用合成基質は、濃度0.01～50mMのプラスミンを用合成基質試薬ユニットを用いる。そのプラスミン試薬とそのプラスミン用合成基質試薬とを1～10℃で0～180日保存して以下の実施に用いる。

【0042】血漿1～20 $\mu$ lにプラスミン試薬50～500 $\mu$ lを添加し、30～38℃で1～10分間、反応させる。得られる混合液に、酵素開裂した後に適当な

波長で測定可能な、プラスミン用合成基質を含む試薬50～500 $\mu$ lを添加し、30～38℃で、酵素反応させ、合成基質添加後、反応終了前の、1分間当たりの適当な波長の吸光度変化を、プラスミン活性の指標として求め、あらかじめこれらの試薬を用いて作成した、検量線より、試料中の $\alpha_2$ -PI量を正確に求めることができる。

【0043】請求項9に係る発明は、濃度0.001～100単位/mlのプラスミン、濃度1～60%の炭素数4～24の非還元性糖、及び濃度0.005～3.0Mの塩を含む、pH6～10のプラスミン溶液を1～30℃で長期間、プラスミンを保存できる。

【0044】

【実施例】

実施例1～3及び比較例1～5

A. プラスミン試薬の14日までの安定性

80mMモノメチルアミン及び200mM塩化ナトリウムを含む200mMトリス-塩酸緩衝液pH7.8を基本組成とし、(a)基本組成(比較例1)、(b)基本組成+20%ソルビトール(20%濃度のソルビトールを含む基本組成、実施例1)、(c)基本組成+20%トレハロース(実施例2)、(d)基本組成+20%スクロース(実施例3)、(e)基本組成+20%グルコース(比較例2)、(f)基本組成+20%ラクトース(比較例3)、(g)基本組成+20%マルトース(比較例4)、(h)基本組成+20%マルトトリオース

(比較例5)の8種の緩衝液にヒトプラスミン(11C Japan社製)を添加したものを、実施例1、2、3及び比較例1～5のプラスミン試薬とした。このプラスミン試薬は、0.08単位/mlである。このプラスミン試薬を5℃及び25℃で14日間保存し、安定性を検討した。

【0045】プラスミン試薬を5℃及び25℃で1～14日保存し、そのプラスミン活性の変化を経時的に追跡した。測定は日立7050自動分析機を使用し、プラスミン合成基質NS-2200(H-D-Gln(C6H11)-Phe-Lys-5AB)8.9mM水溶液をプラスミン用合成基質試薬として、用いた。

【0046】生理食塩水3 $\mu$ lにプラスミン試薬250 $\mu$ lを添加し、37℃で5分間加温した後、プラスミン用合成基質試薬150 $\mu$ lを添加し、添加後60秒後から150秒後までの405nmの吸光度を測定し、プラスミン活性の指標として、1分間当たりの吸光度変化を求めた。なお、この吸光度の変化は、合成基質が開裂して生成する5ABに由来する吸光度の変化に基づく。

【0047】各試薬組成での5℃、及び25℃でのプラスミン活性の経時変化を図1～16に示した。また、試薬調製初日の活性を100%とした14日後の活性%値を表1及び表2に示した。

【0048】

【表1】

	比較例1	実施例1	実施例2	実施例3
5℃	98.4	100.2	99.9	101.6
25℃	77.8	98.0	96.8	97.1

【0049】

【表2】

	比較例1	比較例2	比較例3	比較例4	比較例5
5℃	98.4	90.0	88.5	96.4	91.2
25℃	77.8	71.9	73.6	89.7	80.6

【0050】その結果、ソルビトール、トレハロース、スクロースでプラスミン活性が高度に維持されており、プラスミン試薬の安定化に際し、これらの非還元性糖が大きく関与していることが判明した。

【0051】B. プラスミン試薬の180日間の安定性  
上記Aのプラスミン試薬のうち、比較例1、実施例2、実施例3のプラスミン試薬について、更に長期の安定性

の確認を行った。測定方法は上記Aと同様、合成基質法で行ない、5℃と25℃における180日間の安定性を追跡した。5℃の結果を図17、25℃の結果を図18に示す。比較例1のプラスミン試薬においては5℃及び25℃において明かにプラスミン活性の低下を示すのに対し、実施例2又は実施例3のプラスミン試薬では、5℃においては活性の低下はほとんどなく、25℃におい

でも活性の低下は小さいことが判明した。

【0052】実施例4.  $\alpha_2$ -PIの測定

C.  $\alpha_2$ -PI測定の検量線

上記Aで使用した実施例3(スクロース添加)のプラスミン試薬及びプラスミン用合成基質試薬を調製して、5℃で180日保存した。次に、調製の当日及び180日保存後の試薬での検量線を以下の方法で作成した。なお、検量線作成用の $\alpha_2$ -PIを含む試料は、市販の標準血漿を使用して調製し希釈して行った。

【0053】既知濃度の $\alpha_2$ -PIを含む試料3 $\mu$ lに、実施例3のプラスミン試薬250 $\mu$ lを、添加して、該試薬中のプラスミンと試料中の $\alpha_2$ -PIとを37℃で5分間、反応させ、次に、得られる混合液に、プラスミン用合成基質試薬150 $\mu$ lを添加し、添加後60秒後から150秒後までの405nmの吸光度を測定し、1分間当たりの吸光度変化を、プラスミン活性の指標として求め、検量線を作成した。

【0054】調製当日の検量線の結果を図19、調製後180日経過した試薬での検量線の結果を図20に示す。試薬調製後180日を経ても検量線の形状はほとんど変化せず、プラスミン試薬に非還元性糖類を添加することで、 $\alpha_2$ -PI測定試薬の性能が調製後長期に渡って保持されることが示された。なお、スクロースの代わりに、トレハロース又はソルビトール添加のプラスミン試薬を使用しても、同様の結果が得られた。

【0055】一方、180日保存後の、比較例1の糖無添加のプラスミン試薬で上記と同様に検量線を作成しようとしたが、 $\alpha_2$ -PIを含まない試料と、100%の $\alpha_2$ -PIを含む試料とで、1分間当たりの吸光度変化はほとんど同じ値を示し、検量線を作成することができなかった。

【0056】実施例5  $\alpha_2$ -PIの測定

実際の血漿検体を、本発明の測定方法で測定した。実施例4で使用した試薬で、血漿検体中の $\alpha_2$ -PIを測定し、試薬調製当日及び調製後180日での測定値の相関性をみた。

【0057】 $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターを含む血漿3 $\mu$ lに、調製後5℃で180日保存の、実施例3のプラスミン試薬を、添加して、該試薬中のプラスミンとその $\alpha_2$ -プラスミンインヒビターとを37℃で5分間、反応させ、次に、得られる混合液に、調製後5℃で180日保存の、プラスミン合成基質試薬150 $\mu$ lを、添加し、添加後60秒後から150秒後までの405nmの吸光度を測定し、1分間当たりの吸光度変化を、プラスミン活性の指標として求め、あらかじめ作成した検量線より、試料中の $\alpha_2$ -PI量を求めた。調製当日のプラスミン試薬及びプラスミン合成基質試薬を用いて同様に同一の試料中の $\alpha_2$ -PI量を求めた。

【0058】いくつかの血漿を同様にして血漿検体中の $\alpha_2$ -PIを測定し、試薬調製当日及び調製後180日

の場合の相関を求めた。その結果を図21に示す。回帰式 $Y=0.96X+3.82$ 、相関係数 $r=0.99$ と良好な相関性を示し、スクロースを含むプラスミン試薬ユニットとプラスミン用合成基質試薬ユニットからなる $\alpha_2$ -PI測定試薬は、液状で長期に5℃で保存しても、正確に $\alpha_2$ -PIを測定できることが示された。なお、スクロースの代わりに、トレハロース又はソルビトール添加のプラスミン試薬を使用しても、相関係数は $r=0.99$ であった。

【0059】

【発明の効果】プラスミン試薬の安定化によって、液状の $\alpha_2$ -PI測定試薬の供給が可能となる。使用者側にとっては試薬調製の手間が省ける。さらに、試薬調製の際の調製ミスの回避等の利便性を与える。そのうえ、保管時における省スペース化を可能にできる。一方、製造者側では従来の製法である凍結乾燥という工程を経る必要がないため、製造期間の短縮や設備の面で大きな経費の節減が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】糖無添加のプラスミン試薬(比較例1)の5℃保存下におけるプラスミン活性の14日の変化を表わす。縦軸に1分当たりの吸光度変化量、横軸に経過日数を表わす(縦軸及び横軸は、図1～図16に関しても同じ)。

【図2】糖無添加のプラスミン試薬(比較例1)の25℃保存下におけるプラスミン活性の14日の変化を表わす。

【図3】ソルビトール添加のプラスミン試薬(実施例1)の5℃保存下におけるプラスミン活性の14日の変化を表わす。

【図4】ソルビトール添加のプラスミン試薬(実施例1)の25℃保存下におけるプラスミン活性の14日の変化を表わす。

【図5】トレハロース添加のプラスミン試薬(実施例2)の5℃保存下におけるプラスミン活性の14日の変化を表わす。

【図6】トレハロース添加のプラスミン試薬(実施例2)の25℃保存下におけるプラスミン活性の14日の変化を表わす。

【図7】スクロース添加のプラスミン試薬(実施例3)の5℃保存下におけるプラスミン活性の14日の変化を表わす。

【図8】スクロース添加のプラスミン試薬(実施例3)の25℃保存下におけるプラスミン活性の14日の変化を表わす。

【図9】グルコース添加のプラスミン試薬(比較例2)の5℃保存下におけるプラスミン活性の14日の変化を表わす。

【図10】グルコース添加のプラスミン試薬(比較例2)の25℃保存下におけるプラスミン活性の14日の

変化を表わす。

【図11】ラクトース添加のプラスミン試薬（比較例3）の5℃保存下におけるプラスミン活性の14日の変化を表わす。

【図12】ラクトース添加のプラスミン試薬（比較例3）の25℃保存下におけるプラスミン活性の14日の変化を表わす。

【図13】マルトース添加のプラスミン試薬（比較例4）の5℃保存下におけるプラスミン活性の14日の変化を表わす。

【図14】マルトース添加のプラスミン試薬（比較例4）の25℃保存下におけるプラスミン活性の14日の変化を表わす。

【図15】マルトトリオース添加のプラスミン試薬（比較例5）の5℃保存下におけるプラスミン活性の14日の変化を表わす。

【図16】マルトトリオース添加のプラスミン試薬（比較例5）の25℃保存下におけるプラスミン活性の14日の変化を表わす。

【図17】糖無添加のプラスミン試薬（比較例1）、ト

レハロース添加のプラスミン試薬（実施例2）及びスクロース添加のプラスミン試薬（実施例3）の5℃保存下におけるプラスミン活性の180日の変化を表わす。

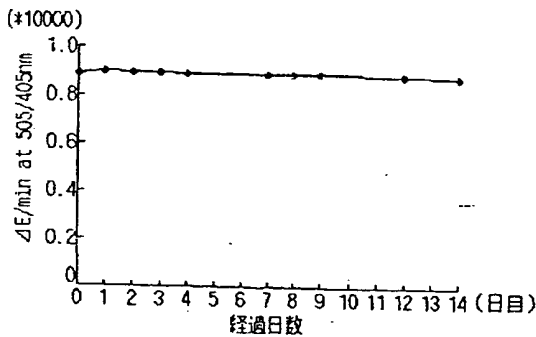
【図18】糖無添加のプラスミン試薬（比較例1）、トレハロース添加のプラスミン試薬（実施例2）及びスクロース添加のプラスミン試薬（実施例3）の25℃保存下におけるプラスミン活性の180日の変化を表わす。

【図19】調製当日の $\alpha_2$ -PIの検量線を示す。縦軸に1分当たりの吸光度変化量（ $\Delta E/\min$ ）、横軸に $\alpha_2$ -PIの量を表わす。

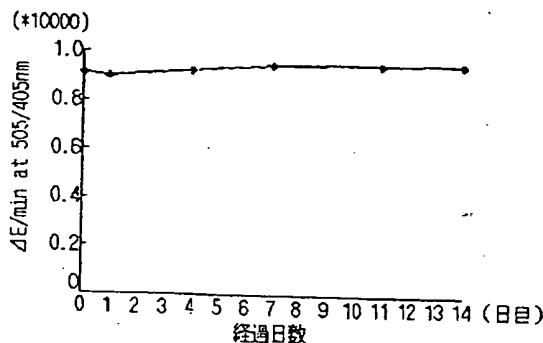
【図20】調製後180日（6か月）後の $\alpha_2$ -PIの検量線を示す。縦軸に1分当たりの吸光度変化量（ $\Delta E/\min$ ）、横軸に $\alpha_2$ -PIの量（%）を表わす。

【図21】本発明測定方法での、試薬調製当日の測定と調製後180日（6か月）保存後の測定との相関性を示す。縦軸に、調製後180日（6か月）保存後のプラスミン試薬及びプラスミン用合成基質試薬を用いた場合の、血漿中の $\alpha_2$ -PIの量（%）を表わし、横軸に調製当日の試薬を用いた場合の血漿中の $\alpha_2$ -PIの量（%）を表わす。

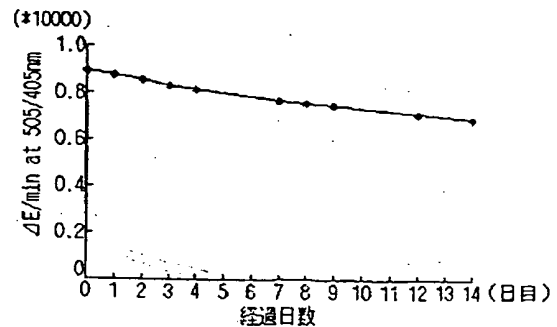
【図1】



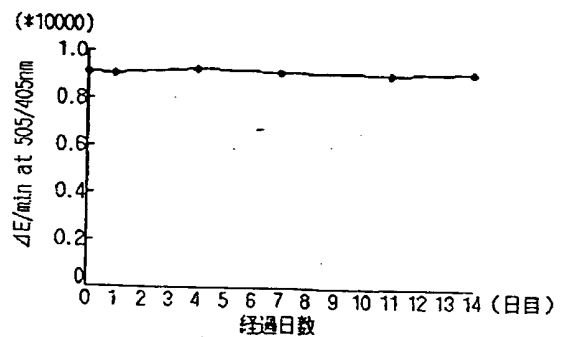
【図3】



【図2】

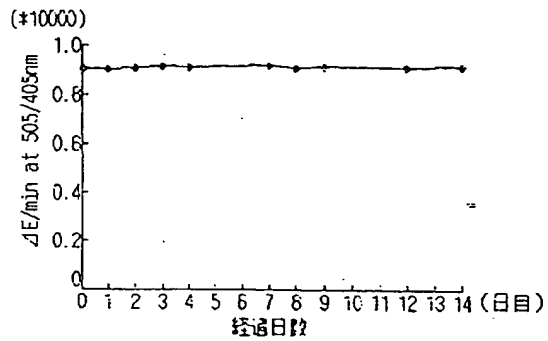


【図4】

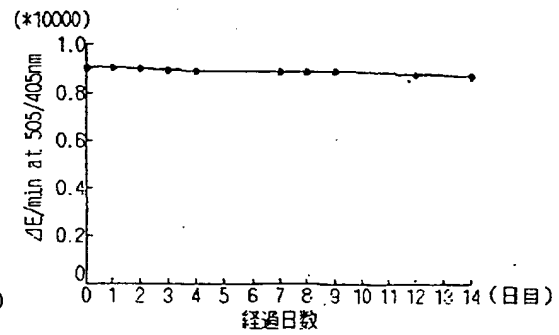




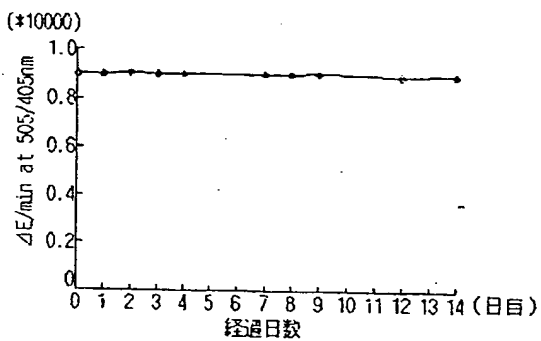
【図5】



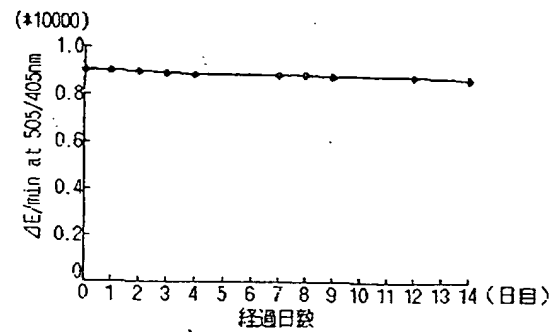
【図6】



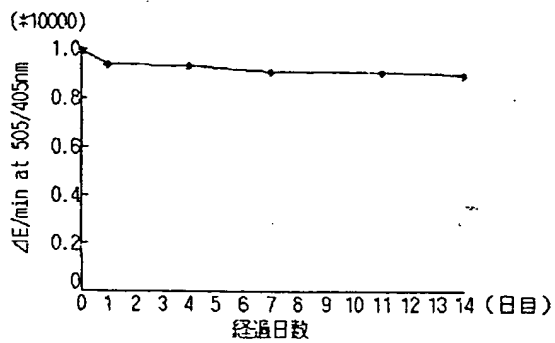
【図7】



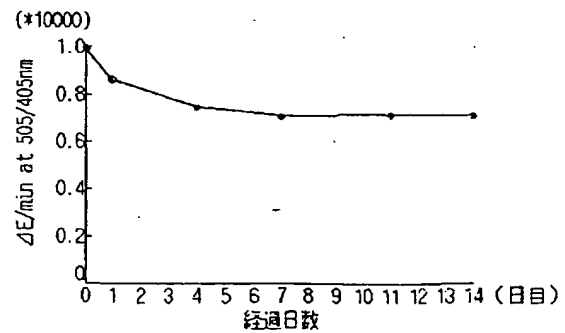
【図8】



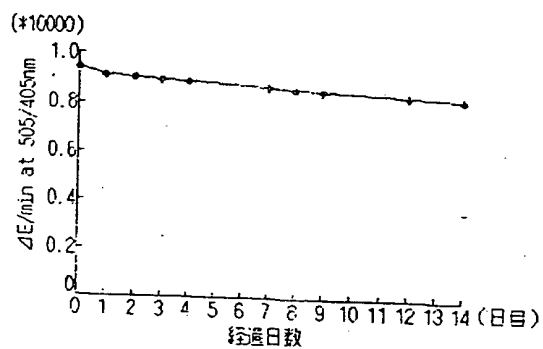
【図9】



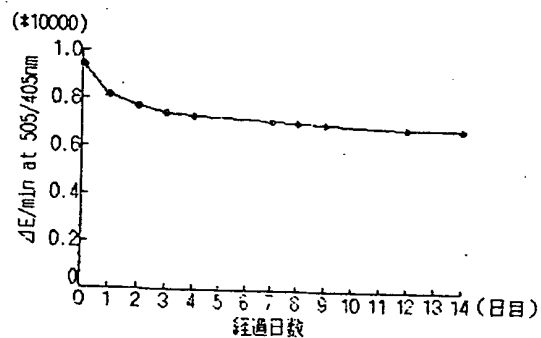
【図10】



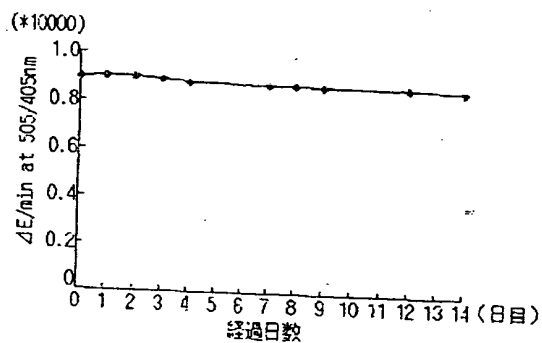
【図11】



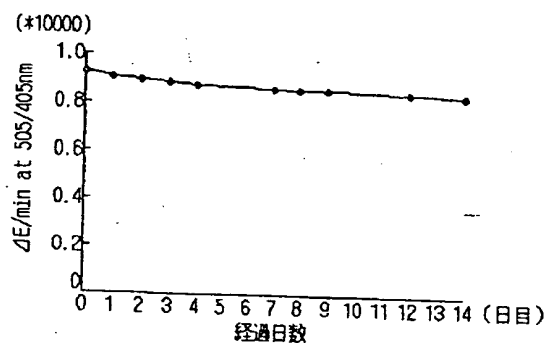
【図12】



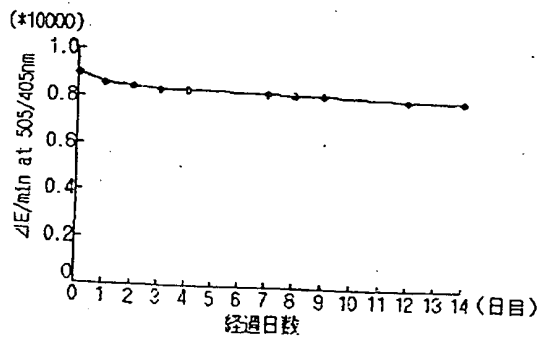
【図13】



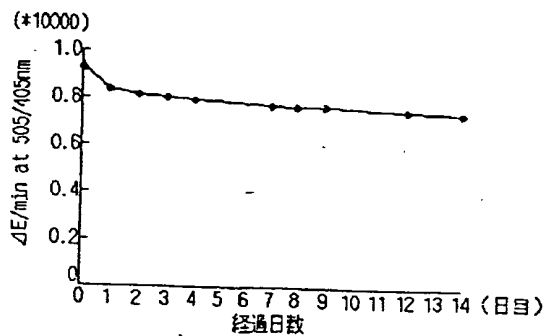
【図15】



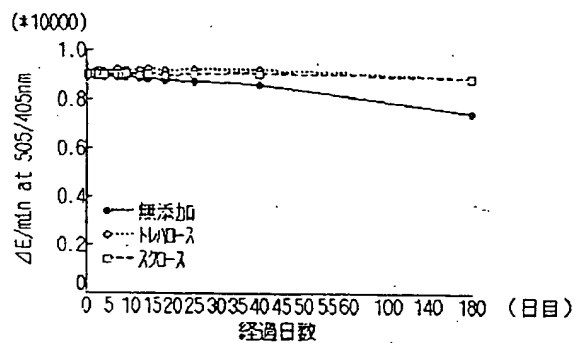
【図14】



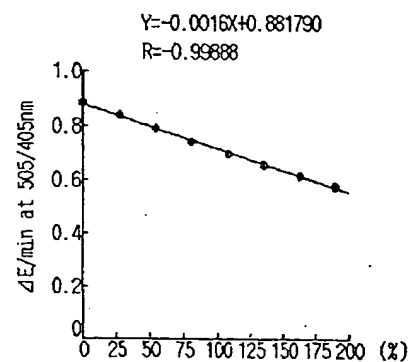
【図16】



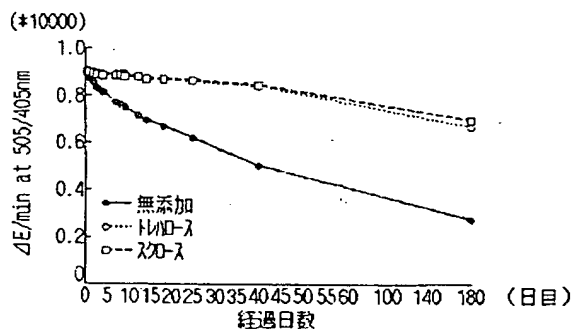
【図17】



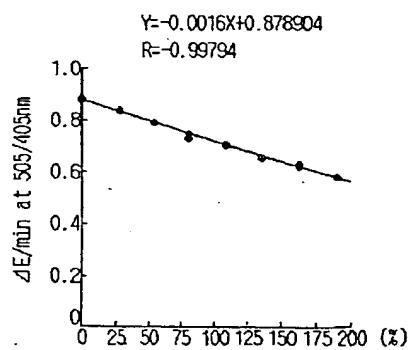
【図19】



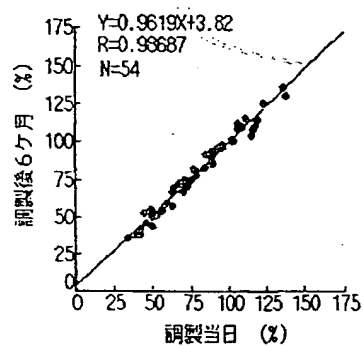
【図18】



【図20】



【図21】



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**